1939
LIBRARY

Aus der
Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim
Direktor: Prof. Dr. Beck

Der Stierhodennährboden nach Hottinger zur Züchtung von Brucella abortus Bang.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von

Fritz Wilhelm Bräuninger

approb. Tierarzt

aus Hammetweil (Wttbg.)

München 1937.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Einleitung.

In den letzten Jahren häuften sich die Fälle von Bangbakterieninfektion beim Menschen. Als Ursache dieser Erkrankung kommt in den allermeisten Fällen die Ansteckung durch Rinder in Frage, die an „seuchenhaftem Verkalben" erkrankt sind. Die Uebertragung auf den Menschen geschieht sowohl durch Kontaktinfektion, als auch in der Mehrzahl der Erkrankungen durch den Genuß von bangbakterienhaltiger, ungekochter Milch, oder den daraus hergestellten Produkten.

Nach diesen Feststellungen mußten auch die Bekämpfungsmaßnahmen des „infektiösen Abortus" unserer Rinderbestände dahingehend geändert werden, daß sie dem Schutze der menschlichen Gesundheit Rechnung tragen. So wurde vom Reichsminister des Innern ein grundsätzliches Verbot ausgesprochen für die Immunisierung der Rinder mit lebenden Bangkulturen, da eindeutig festgestellt worden war, daß dadurch eine Vermehrung der Dauerausscheider hervorgerufen wurde. Die neuen Bekämpfungsmaßnahmen sind in der Hauptsache hygienischer Art und verlangen eine vollständige Absonderung bzw. Ausmerzung der Abortus-Bangbakterien ausscheidenden Tiere.

Auch das Milchgesetz vom 31. Juli 1930, das am 1. Januar 1932 in Kraft getreten ist, wurde in obigem Sinne ausgearbeitet. Hier wird in § 4, Abs. 1, Ziff. 3 der ersten Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes vom 15. November 1931 festgelegt, daß Milch von Kühen, die infolge einer Infektion mit dem Abortusbakterium Bang erkrankt sind oder diesen Erreger in der Milch ausscheiden, nur nach vorheriger ausreichender Erhitzung in den Verkehr gebracht werden darf.

Diese Maßnahmen setzen aber eine sichere und möglichst rasche Erfassung der Abortus-Bangbakterien ausscheidenden Tiere voraus.

Zur Feststellung solcher Ausscheider, wie zum Nachweis des Vorliegens der Banginfektion bei abortierten Früchten wird fast ausschließlich der Meerschweinchenversuch verwendet. Diese Methode hat prozentual die besten Ergebnisse, jedoch den großen Nachteil, daß mindestens 3—4 Wochen nötig sind, um auf diesem Wege ein Ergebnis zu erhalten. Dem Tierversuch haften aber noch andere Mängel an; z. B. das vorzeitige Verenden von Tieren, sowie die Kontaktinfektion bei gemeinsamer Stallhaltung, die von Stockmayer (41) beschrieben wird; auch kommen Fälle vor, in denen die Bangbakterien im Meerschweinchen nicht angehen. Die Tierversuche sind zudem sehr kostspielig und bringen eine recht unliebsame Verteuerung der Untersuchungskosten mit sich.

Es wurde deshalb versucht, den direkten kulturellen Nachweis der Abortus-Bangbakterien aus der Milch und aus infizierten Nachgeburtsteilen und Föten zu den Untersuchungen heranzuziehen. Dieser bietet die Vorteile, daß er schon nach 4—5 Tagen ein Ergebnis liefert, das besonders bei Züchtung aus der Milch zugleich Aufschluß gibt über die Anzahl der darin enthaltenen Keime (Stockmayer). Die Bangbakterien wachsen, soferne ihnen optimale Bedingungen geboten werden, in leicht erkennbaren typischen Kolonien, die mit anderen Keimen nicht zu verwechseln sind. Der Hauptnachteil der Kulturmethode ist der, daß das zur Untersuchung gelangende Material meistens sehr stark mit Verunreinigungskeimen angereichert ist, die, rascher wüchsig, auf den Nährböden die langsam wachsenden Bangbakterien in kurzer Zeit überwuchern und so ein Erkennen der letzteren unmöglich machen.

Eine Reihe von Arbeiten, die in den letzten Jahren über den kulturellen Nachweis der Abortus-Bangbakterien aus der Milch erschienen sind, lassen jedoch erkennen, daß diesen Hindernissen mit Erfolg entgegengetreten werden kann. So berichtet Huddleson (16) 1927 über so gute Ergebnisse mit dieser Methode, daß er den Kulturversuch dem Tierversuch gleichwertig bezeichnet. Thompson (43) gelang der züchterische Nachweis in 90% der Milchproben, die Abortusbakterien enthielten.

Pröscholdt (27) schreibt von 80% positiven Ergebnissen und glaubt den Tierversuch teilweise entbehren zu können. Auch Stockmayer (39) hält den Kulturversuch für durchaus brauchbar, besonders zur Untersuchung von Einzelmilchproben; ebenso gute Erfolge lassen die Versuche von Klitschmüller (21) erkennen. Karsten und Bischoff (18) können 42% und Karsten (17) von 38% positiven Ergebnissen berichten.

Das Kulturverfahren findet allerdings auch in manchen Arbeiten eine weniger günstige Beurteilung. So schreiben Köser und Plate (22) von 22% und Haal (12) von 17 v. H. positiven Ergebnissen. Auch Gorlani (11) sieht diese Methode als nicht ausreichend an, um dadurch auf den Tierversuch verzichten zu können.

Wie man sieht, stehen sich also hier gute und schlechte Ergebnisse des Kulturverfahrens gegenüber und ebenso sind die Ansichten der einzelnen Autoren geteilt. Entscheidend für die Reinkultivierung der Bangbakterien aus Milch und Organmaterial ist die Unterdrückung der Verunreinigungsbakterien auf den Nährböden, um zu verhindern, daß die Bangkolonien von denselben überwuchert werden. Bei der Milch ist außerdem noch zu berücksichtigen, daß die Ausscheidung der Bangbakterien mengenmäßig wechselt, wodurch sehr oft Fehlresultate bedingt werden. Die Zahl der Abortus-Bangbakterien kann oft auch sehr gering sein, da in vielen Fällen dieselben nur in einem Viertel ausgeschieden werden. Ferner spielen die Zusammensetzung der Nähr-

böden, die Züchtungsbedingungen und die Züchtungstechnik eine wesentliche Rolle.

Im allgemeinen sind sich aber die meisten Forscher darin einig, daß bei weiterer Verbesserung des Kulturnachweises auch die Leistungen desselben so erhöht werden können, daß sie schließlich den Anforderungen der Veterinärhygiene genügen und dann eine weitgehende Ausschaltung des Tierversuches zulassen.

Schrifttum.

Zum ersten Male gelang es den Amerikanern Schröder und Cotton (33), das Vorkommen von Bangbakterien in der Milch nachzuweisen. Sie verimpften die Milch an Meerschweinchen und kultivierten das Bakterium Abortus-Bang aus der Milz derselben. Damit war für viele andere Forscher eine Anregung gegeben, auf diesem Gebiet weiterzuarbeiten und den direkten Kulturnachweis auszubauen.

So versuchte Evans (6) die Abortus-Bangbakterien auf Milchzuckeragarplatten zu züchten, denen sie 10% steriles Rinderserum zufügte. Einen anderen Weg schlug Winkler (44) ein, der die Bakterien erst in aseptisch gewonnener Milch durch 5—7tägige Bebrütung bei 37° C anzureichern versuchte und erst dann den Plattenversuch auf phenolphtaleïnneutralen Nährböden aus gewöhnlichem Agar anschloß. Lerche (23) machte Versuche mit Conradi-Drigalskiplatten, hatte aber keine Erfolge damit, so daß er zu Kalbfleischagar überging mit einem Zusatz von 10% Rinderserum, der ihm bessere Ergebnisse lieferte.

Stafseth (34) führte seine gutgelungenen Kulturversuche auf Milz- und Leberbrühagar zurück; ersterem fügte er noch 1% Stärke und Dextrose zu, bei letzterem hielt er diesen Zusatz nicht für notwendig. Auch Drescher und Hopfengärtner (3) züchteten auf Leberbrühagar mit Zusatz von 0,5% Traubenzucker, 2% Glyzerin und Amnionsflüssigkeit vom Rind. Dieselben guten Erfahrungen mit Leberbrühagar machte Pröscholdt (27), der diesem nach Versuchen mit Rinderserum-, Milch-, Glyzerin-, Milchzucker-, Traubenzucker-, Lackmus-Laktoseagar den Vorzug gab. Schließlich verwendete auch Summa (42) Leberbrühagar mit 0,5% Traubenzucker und 2% Glyzerin. Steck (36) züchtete auf Peptonschottenagarplatten und Schüttelkulturen. Bei ihm wuchsen die Bangbakterien als kleine punktförmige Kolonien unter der Oberfläche. Thompson (43) verwendete schließlich wieder Leberbrüh-Schräg- und Plattenagar.

Die Hauptschwierigkeit bei der Züchtung der Bruc. Ab. Bang aus der Milch liegt, wie schon oben erwähnt, in der gleichzeitigen Anwesenheit von Begleitbakterien, die, anspruchsloser als der Bangbazillus, auf den Nährböden sehr rasch wachsende Kolonien bilden

und dadurch die langsam wachsenden, meist kleinen Bangkolonien entweder nicht aufkommen lassen oder in kurzer Zeit überwuchern. Es lag deshalb nahe, durch geeignete Zusätze zu den Nährböden die Begleitbakterien zu vernichten oder in ihrer Entwicklung zu hemmen.

Braun und Schäffer (32) gingen deshalb dazu über, die Begleitbakterien durch Zusatz von Karbolsäure zu hemmen. Die Karbolsäure erwies sich jedoch nicht als besonders geeignet für diesen Zweck, da sie die Bangbakterien ebenfalls schwer schädigt. Dies beweisen auch die späteren Versuche von Drescher und Hopfengärtner (3), die bei ihren Bangzüchtungsversuchen aus Organmaterial und Milchprodukten dieselbe ihrem Traubenzucker- Glyzerin-Leberagar zusetzten. Huddleson (16) gab einen Zusatz von Kupfersulfat im Verhältnis 1 : 20 000 an.

Man kam dann aber von diesen Zusätzen schnell wieder ab, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Anilinfarben sich für diese Zwecke viel besser eignen. Churchman (2) machte seine Versuche zum ersten Male mit Gentianaviolett im Verhältnis von 1 : 75 000 bis 1 : 100 000. Auch Stafseth und Huddleson (35) setzen ihrem Leberbrühagar Gentianaviolett zu und erreichen dabei eine weitgehende Hemmung der Begleitbakterien; ebenso hatte Pröscholdt (27) mit Gentianaviolett 1 : 100 000 gute Erfolge. Nach Karsten (17) genügte zu dessen Glyzerinagar mit 10—15% Serum schon ein Zusatz von Gentianaviolett im Verhältnis 1 : 200 000. Eine nochmalige Bestätigung fanden diese Versuche bei Karsten und Bischoff (18). Haupt (13), der zur Züchtung 10%igen Rinderserumagar verwandte, gab einen Zusatz von Bromthymolblau als Indikator und von basischem Fuchsin 1 : 50 000 als hemmenden Faktor an. Stockmayer (39) erzielte die besten Ergebnisse mit 10%igem Rinderserumagar und Zusätzen von Gentianaviolett 1 : 250 000 und Malachitgrün 1 : 500 000; letzteres hemmt besonders die Mastitis-Streptokokken. Zeller (46) fand Gentianaviolett und Dahlia im Verhältnis von 1 : 10 000 dem Traubenzucker-Rinderserumagar zugesetzt, als ungefähr gleich gut in ihrer Wirkung. Nach Klitschmüller (21) haben Pyronin, Rivanol, Thionin, Trypanrot, Trypanblau als Zusätze zum Leberbrühagar keine hemmende Wirkung auf die Begleitbakterien.

Eosin und Methylenblau wirken besser gemeinsam als einzeln. Ungeeignet sind ferner Kochsalz und Soda.

Günstiger zu betrachten sind nach Haupt (13) Fuchsin 1 : 50 000 und Kupfersulfat 1 : 7500. Beste Ergebnisse lieferte ihm jedoch Gentianaviolett zusammen mit Malachitgrün in der von Stockmayer (39) angegebenen Verdünnung.

Weigmann (44) teilte mit, daß Kristallviolett, Brillantgrün und Malachitgrün die Bangbakterien zu stark hemmen, während Pikrin-

säure gar keinen hemmenden Einfluß hat. Dagegen zeigte sich auch bei seinen Versuchen die gute hemmende Wirkung von Gentianaviolett. Auch Hauptmann (14) hält bei seinen Züchtungsversuchen von Bangbakterien aus Patientenblut den Leberbrühagar mit Gentianaviolett am besten geeignet. Er hat jedoch auch die hemmende Wirkung des Viktoriablau 4 R ausprobiert, das er in der Verdünnung von 1 : 10 000 einem 3%igen Glyzerinagar mit 20% defibriniertem, sterilem Rinderblut zusetzte. Er stellte fest, daß eine solche Verdünnung die Bruc. Abort. Bang nicht schädigt, während alle Begleitbakterien, die größtenteils gram + sind, gehemmt werden. Für eiweißärmere Nährböden hält er eine größere Verdünnung des Viktoriablau 4 R für genügend.

Die Wasserstoffjonenkonzentration der Nährböden hat auf das Wachstum der Abortus-Bangbakterien ebenfalls einen bedeutenden Einfluß. Nach Stickdorn (37) sind die Wachstumsgrenzen bei p. H. 7,0 und p. H. 8,2. Bestes Wachstum hatte er bei p. H. 7,2—7,3, während Zeller (46) p. H. 7,3—7,5 und Huddleson (16) p. H. 6,4—6,8 angeben. Stockmayer (39) hält einen p. H. Gehalt von 7,4—7,6 als bestgeeignet für das Wachstum der Bangbakterien.

Bekanntlich wachsen die Abortusbakterien nicht bei gewöhnlicher Luftzusammensetzung, sondern sie beanspruchen eine besondere Zusammensetzung der Atmosphäre bezüglich des Sauerstoff-Kohlensäureverhältnisses. Am besten eignet sich nach Smith (30) und Frisch (10) eine 10%ige Kohlensäureatmosphäre, zu deren Herstellung früher hauptsächlich das Symbioseverfahren verwendet wurde. Man züchtete die Bangbakterien in verschlossenen Gefäßen zusammen mit anderen Bakterien, die Sauerstoff aufbrauchen; dazu verwandte Nowak (25) [Zit. n. Klitschmüller] den Bac. subtilis; Smith und Fabyan (31) arbeiteten mit Bact. coli und Staphylokokken; auch Fried (9) empfahl das Nowak'sche Verfahren mit Bact. coli. Ascoli (1) hatte dagegen gute Erfolge mit Bac. anthracis. Stafseth (34) konstruierte einen eigenen Apparat, in dem er durch eine Pumpe die Luft verdünnte. Er hält diese Methode für ebenso sicher wie das Nowak'sche Verfahren.

Huddleson (Zit. nach Lübke 24) erzeugte eine 10%ige Kohlensäureatmosphäre in einem geschlossenen Gefäß mittels doppelkohlensaurem Natron und je 2 ccm konz. Schwefelsäure pro Liter Luftraum. Wiederum einen anderen Weg zur Herstellung der gewünschten Luftzusammensetzung wählte Lübke (24), der Alkohol verbrennen ließ, wobei Sauerstoff verzehrt wurde. Ein einfaches Verfahren wird von Haupt (13) beschrieben; hier werden mittels zweier Meßgefäße aus einer Stahlflasche 10% des Luftinhaltes des betreffenden Kulturgefäßes durch Kohlensäure ersetzt und das Gefäß fest verschlossen. Ehrlich (4), Rudolf (29) und Frisch (10) züchteten auf

Schrägagarröhrchen, in die sie Leuchtgas einleiteten und dann mit Paraffin verschlossen.

Eine Verbesserung der Ergebnisse des Kulturnachweises läßt sich weiterhin erreichen durch geeignete Anreicherungsverfahren. Beim Stehenlassen der Milch sammeln sich die Bangbakterien in großer Zahl im Rahm an. Beim Ausschleudern gehen dagegen die Bakterien größtenteils in den Bodensatz über; es ist auch die am meisten empfohlene Methode, der Stockmayer, Klimmer, Karsten u. a. den Vorzug geben. Um zu verhindern, daß sich vor allem die Begleitbakterien im Bodensatz ansammeln, wird von Klimmer und Klitschmüller (20) dreimaliges fraktioniertes Ausschleudern empfohlen. Sie gehen von der Tatsache aus, daß die Verunreinigungsbakterien sich am leichtesten ausschleudern lassen und gießen deshalb nach 5 Minuten die Milch ab und zentrifugieren dieselbe weiter. Noch ein anderes Verfahren wird von denselben Autoren beschrieben. Die Milch wird erst 5 Minuten zentrifugiert und dann vom Bodensatz abgegossen. Diese abgegossene Milch wird mit 1% bangagglutinierendem Serum versetzt und 2 Stunden bei 37° C gehalten. Dabei sollen die Bangbakterien agglutinieren und sich bei nachfolgendem Ausschleudern in größerer Anzahl im Bodensatz vorfinden.

Um zu verhindern, daß sich auf dem Weg zwischen Stall und Laboratorium die Milch durch das Ueberhandnehmen der Verunreinigungsbakterien zersetzt und um allgemein das Wachstum derselben zu unterdrücken, empfiehlt Stockmayer (38) einen Zusatz von 0,5—1% Borsäure zu der Milch. Diese Methode erleichtert besonders in der wärmeren Jahreszeit den Kulturversuch, da eine weitgehende Verminderung der Begleitbakterien beobachtet werden kann.

Die Frage, ob Anfangs- Mittel- oder Endgemelk verwendet werden soll, wird von den einzelnen Autoren sehr verschieden beantwortet. Klimmer (19), Karsten und Bischoff (18) und Lerche (23) bevorzugen das Endgemelk. Nach Stockmayer (39) geben alle 3 Gemelke gleiche Ausbeute. Da die Ausscheidung oft sehr verschieden stark sein kann und einem ständigen Wechsel unterworfen ist, empfiehlt es sich, mehrmalige Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen.

Eigene Versuche.

Es wurde mir die Aufgabe gestellt, Versuche anzustellen über die Eignung des von Hohn und Hermann (15) beschriebenen Hottinger'schen Stierhoden-Nährbodens zur Züchtung des Bact. ab. Bang.

Wenn man davon ausgeht, daß die Hoden Lieblingssitze der Brucellen sind, scheint ein aus solchem Material gewonnener Nährboden schon des Versuches wert.

Bei meinen Versuchen habe ich erst mit gutwachsenden Bangkulturen gearbeitet und anschließend züchtete ich aus Organmaterial und Milch. Als Nährmedium nahm ich erst Hottingerbrühe in verschiedenen Verdünnungen, um dann zum Hottinger Agar überzugehen. Durch Farbzusätze zu diesem Agar versuchte ich eine elektive Wirkung zu erzielen und außerdem sollte das Wachstum der Bangbakterien noch verbessert werden durch weitere Zusätze von Traubenzucker, Glyzerin und Rinderserum.

Die Herstellung des Hottinger'schen Nährbodens wird von Hohn und Hermann (15) wie folgt beschrieben: Die Hoden, ein Abfallprodukt der Schlachthöfe, werden einige Tage vor der Zubereitung gesammelt. Verarbeitet werden auf einmal etwa 10 kg.

1. Die Hoden werden vom Samenstrang und den bindegewebigen Häuten befreit.
2. Das gesamte Rohmaterial wird gewogen.
3. Für 1 kg Hoden werden 1½ Liter Wasser abgemessen und die Wassermenge zum Kochen gebracht. Auf ½ kg Hoden kommen 750 ccm Wasser, wir bezeichnen diese Menge als eine Portion Hottingerbrühe.
4. Jeder Hoden wird der Länge nach in 4 Teile geschnitten und diese in das kochende Wasser gegeben.
5. Das Ganze wird 10 Minuten lang gekocht.
6. Die koagulierten Hoden werden mit dem Schaumlöffel herausgeholt und durch die Fleischmaschine gedreht.
7. Die durchgedrehte Hodenmasse wird gewogen.
8. Unterdessen Abkühlen der Brühe im Spülstein auf 40° C.
9. Die durchgedrehte, abgewogene Hodenmasse wird durch das ursprüngliche Gewicht in Pfunden geteilt: z. B. Ursprungsgewicht 9 Pfund, nach dem Mahlen 1710 g; dann 1710 g:9 = 190 g Hoden.
10. Auf diese 190 g Hoden kommen 750 ccm Brühe = 1 Portion. Die Portionen werden je nach Größe der vorhandenen Flaschen zu 1,2 oder 3 eingefüllt.
    Die Flaschen müssen außerdem genügend Schüttelraum haben.
11. Gute Alkalisierung gegen Lackmuspapier mit n-Sodalösung. Die Reaktion geht bei der Verdauung meist etwas zurück.
12. Per Portion ½ Teelöffel Pankreatin zugeben.
13. Der Portion 15 ccm Chloroform. Gut durchschütteln.
14. Die Flaschen kommen für 2 Tage in den Brutschrank und werden mehrmals täglich geschüttelt. Die Hoden müssen gut verdaut sein. Schlammsediment.
15. Die Reaktion wird am 2. Tage geprüft. Meist muß nochmals n-Sodalösung zu jeder Flasche zugegeben werden.
16. Am 3. Tage ist der Verdauungsprozeß meist abgeschlossen. Die

Verdauung wird nun völlig unterbrochen durch Zufügen von reiner HCl bis zur Rötung von Lackmuspapier.

Die Herstellung der Hottingerbrühe gestaltet sich nun sehr einfach. Für 1 Liter Bouillon:

1.) Zu 200 ccm Hottingerbrühe nach Durchschütteln der Flasche kommen 400 ccm Wasser.
2.) 20 Minuten Einstellen in den Dampftopf zur Vertreibung des Chloroforms und zur besseren Filtration später.
3.) Filtrieren und Auffüllen auf 1 Liter mit Wasser.
4.) Hinzufügen von 1 g Kaliumphosphat ($K^2 HPO^4$) und 20 ccm konz. NaCl-Lösung.
5.) Alkalisieren. Einstellen auf pH 7,6. Nachsterilisieren.

Versuch 1.

Zunächst habe ich Züchtungsversuche angestellt mit Stierhodenbouillon nach Hottinger in 3 verschiedenen Verdünnungen, um zu prüfen, wie sich Bangbakterien diesem Medium gegenüber verhalten.

Die Herstellung war folgendermaßen:

Bouillon I: 200 ccm Hottingerbrühe,
+ 800 ccm Aqu. dest.,
+ 1 g ($K^2 HPO^4$),
+ 20 ccm konz. NaCl-Lösung.

Bouillon II: 200 ccm Hottingerbrühe,
+ 300 ccm Aqu. dest.,
+ 0,5 g ($K^2 HPO^4$),
+ 10 ccm konz. NaCl-Lösung.

Bouillon III: 200 ccm Hottingerbrühe,
+ 0,2 g ($K^2 HPO^4$),
+ 4 ccm konz. NaCl-Lösung.

Als Vergleich verwandte ich Rindfleischbouillon und Leberbrühe je mit pH-Gehalt von einmal 7,4 und einmal 7,6.

Von jeder Brühe wurden 8 Röhrchen mit je 5 ccm Inhalt beimpft. Ausgangsmaterial war ein gutwachsender Laboratoriumsstamm von Bruc. abort. Bang, der aus den Organen eines infizierten Meerschweinchens gezüchtet worden war. Von diesem Stamm wurde eine Bakterienaufschwemmung von Testdichte hergestellt. Jedes Röhrchen wurde nun mit 0,05 ccm dieser Bakterienaufschwemmung beimpft und bei 37° C bebrütet.

Nach 3 und 6 Tagen wurde der Inhalt von je 4 Röhrchen einer jeden Bouillon 20 Minuten lang in Trommsdorfröhrchen zentrifugiert und die Höhe des Bodensatzes abgelesen. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt; die angegebenen Werte entsprechen Kubikzentimetern.

Tabelle 1.

	Bebrütung 3 Tage bei 37° C				Bebrütung 6 Tage bei 37° C			
Hottinger-bouillon I	0,04	0,04	0,03	0,04	0,055	0,05	0,045	0,05
Hottinger-bouillon II	0,035	0,045	0,03	0,035	0,05	0,045	0,045	0,05
Hottinger-bouillon III	0,025	0,03	0,03	0,02	0,04	0,05	0,025	0,03
Leberbouillon pH 7,4	0,03	0,03	0,025	0,025	0,05	0,04	0,045	0,045
Leberbouillon pH 7,6	0,03	0,03	0,03	0,025	0,035	0,04	0,045	0,045
Rindfleischbouillon pH 7,4	0	0	0	0	0	?	0	?
Rindfleischbouillon pH 7,6	0,02	0,025	0,03	0,03	0,025	0,02	0,025	0,03

Ergebnis.

Dieser Versuch läßt erkennen, daß die Hottingerbouillon sich zur Züchtung der Bangbakterien gut eignet. Die Hottingerbouillon I, die nur $^1/_3$ ihres Volumens Hottingerbrühe als Nährbodengrundlage hat, ist der Hottingerbouillon III, dem unverdünnten Nährboden, entschieden überlegen. Die Stärke des Wachstums ist sogar derjenigen in Leber- und Rindfleischbouillon überlegen. Ein Unterschied im Wachstum bei den verschiedenen Wasserstoffjonenkonzentrationen der Leberbouillon ist nicht festzustellen, dagegen zeigt sich bei Rindfleischbouillon ein gänzlicher Ausfall der Röhrchen mit pH 7.4.

Versuch 2.

Nachdem der erste Versuch ein erfolgversprechendes Ergebnis brachte über die Eignung der Stierhodenbouillon zur Bangzüchtung, sollte dieser Versuch Aufschluß geben über das Wachstum der Bangbakterien auf verschiedenen festen Nährböden. Zur Herstellung eines 2% igen Agars wurde die Hottingerbouillon verwendet, die im 1. Versuch das beste Ergebnis brachte (Hottingerbouillon I). Es mag hier gleich angeführt werden, daß diese der Grundnährboden auch für sämtliche weitere Versuche war. Weiterhin sollte hier der Einfluß von Traubenzucker und Glyzerin, die in Mengen von 0.5 bzw. 2% diesem Nährboden zugesetzt wurden, auf das Wachstum der Bangbakterien festgestellt werden.

Zum Vergleich wurde ein 2% iger Leberagar und 2% Rindfleischagar herangezogen. Der pH-Gehalt war diesmal überall auf pH 7.7 eingestellt.

Das Impfmaterial bildete wiederum ein Abortus-Bangstamm, der schon lange an aerobes Wachstum gewöhnt war. Jede Platte wurde mit 0,05 ccm einer zehnfach verdünnten Aufschwemmung von Testdichte beimpft und das Material mit dem Drigalskispatel ausgestrichen.

Tabelle 2.

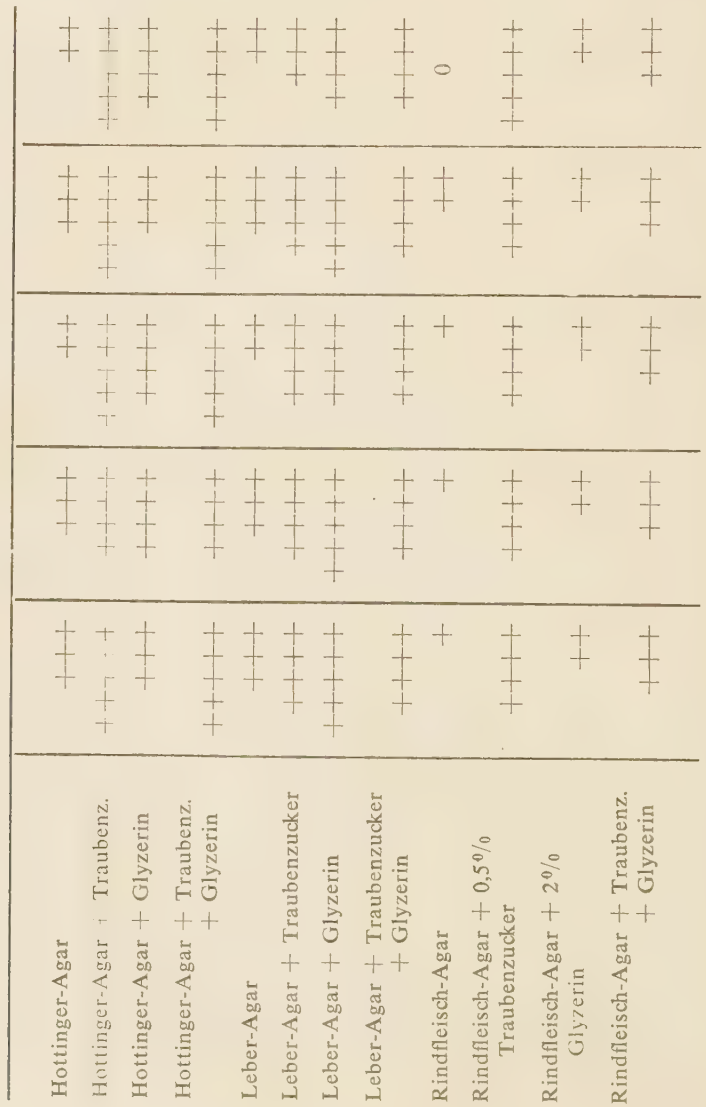

Tabelle 2a.

Hottinger-Agar	++	++	++	++	++
Hottinger-Agar + Traubenz.	+++	+++	+++	+++	+++
Hottinger-Agar + Glyzerin	+++	++	+++	+++	+++
Hottinger-Agar + Traubenz. + Glyzerin	++++	+++	+++++	+++++	+++++
Leber-Agar	0	0	+	0	0
Leber-Agar + Traubenzucker	0	0	+	0	0
Leber-Agar + Glyzerin	++	0	0	++	+
Leber-Agar + Traubenzucker + Glyzerin	0	0	0	+	+
Rindfleisch-Agar	0	0	0	0	0
Rindfleisch-Agar + Traubenz.	+++	++++	+++	++	+++
Rindfleisch-Agar + Glyzerin	0	0	0	0	0
Rindfleisch-Agar + Traubenz. + Glyzerin	+	0	0	0	0

Zeichen-Erklärung zu Tabelle 2 und 2a;

0 = kein Wachstum,

\+ = vereinzelte Kolonien,

++ = mehrere einzelne Kolonien,

+++ = mäßige Zahl von Einzelkolonien oder dünnes flächenmäßiges Wachstum,

++++ = zahlreiche, teils zusammenfließende große Kolonien,

+++++ = sehr starkes konfluierendes Wachstum.

Von jedem Nährboden wurden 10 Platten angelegt. Davon wurde die Hälfte unter aeroben Wachstumsbedingungen gezüchtet (siehe Tabelle 2), die andere Hälfte wurde in Weckgläsern, in denen nach dem Haupt'schen Verfahren eine 10%ige Kohlensäureatmosphäre hergestellt worden war, 5 Tage lang bei 37° C bebrütet (s. Tabelle 2a).

Ergebnis.

Nach Tabelle 2 liefert der Hottinger-Agar ein gleichmäßiges gutes Ergebnis; der Leberagar steht diesem nicht nach, dagegen fällt der Rindfleischagar ab. Die Zusätze von Traubenzucker und Glyzerin fördern allgemein das Wachstum der Bangbakterien.

Eigenartig ist dagegen das Ergebnis der Tabelle 2a, die das Wachstum derselben Kultur auf den gleichen Nährböden unter Kohlensäurespannung veranschaulicht. Hier hat sich nur der Hottinger-Agar durchgesetzt, während die beiden anderen Nährböden nahezu ganz ausfielen. Dieser Ausfall läßt sich nur dadurch erklären, daß der zur Impfung verwendete Bangstamm an aerobes Wachstum gewöhnt war und ihm hier ungünstige Bedingungen geboten wurden. Von solchen Bedingungen ist der Abortusbazillus auf Hottinger-Agar weniger abhängig, insbesondere nicht, wenn dieser Nährboden mit Zusätzen von Traubenzucker und Glyzerin ausgestattet ist, wie ein Vergleich der Tabelle 2 und 2a beweist.

Die Zusätze von 0,5% Traubenzucker und 2% Glyzerin zum Hottinger-Agar wurden deshalb auch in den folgenden Versuchen beibehalten.

Versuch 3.

Die beiden ersten Versuche haben gezeigt, daß der Hottinger'sche Stierhodennährboden sich zur Züchtung von Bangkulturen sehr gut eignet, ja sogar andere Nährböden teilweise an Leistung übertrifft. Im nächsten Versuch wurden dem Hottinger-Agar noch Farbstoffe zugegeben. Es sollte geprüft werden, inwieweit der Zusatz von Farbstoffen, der zur Unterdrückung der Begleitbakterien bei der Züchtung aus Abortus- Organmaterial oder Milch sich als notwendig erwiesen hatte, beim Hottinger-Agar hemmend auf das Wachstum von Abortus-Bangkultur wirkt. Zur Unterdrückung der Begleitbakterien hat sich Gentianaviolett im Verhältnis von 1:250 000 zusammmen mit Malachitgrün in der Verdünnung von 1:500 000 am besten bewährt. Diese Farbstoffe in den obigen Verdünnungen wurden nun dem Hottingeragar zugefügt. Als Vergleich wurde wie in dem vorigen Versuch wieder Leberagar und Rindfleischagar verwendet.

Von diesen Nährböden wurde eine Serie Platten ohne Farbzusatz hergestellt, die zweite Serie mit Zusatz von Malachitgrün in der Verdünnung 1 : 500 000, eine weitere Serie mit Gentianaviolett 1 : 250 000 und die vierte Serie mit beiden Farblösungen zusammen.

Tabelle 3.

Nährboden	ohne Kohlensäure	mit technischer Kohlensäure	
Hottinger-Agar	+++	++++	+++
Hottinger-Agar + Mal. 1 : 500 000	+++	++++	++++
Hottinger-Agar + Gent. 1 : 250 000	++	+++	+++
Hottinger-Agar + Mal. + Gent.	+++	+++	+++
Leber-Agar	+++	+++	++++
Leber-Agar + Mal.	++++	+++	++++
Leber-Agar + Gent.	+++	++++	+++
Leber-Agar + Mal. + Gent.	+++	+++	++++
Rindfleisch-Agar	+	+	++
Rindfleisch-Agar + Malach.	0	0	0
Rindfleisch-Agar + Gent.	0	0	0
Rindfleisch-Agar + Gent. + Mal.	+	+	+

Das Impfmaterial war dasselbe wie im 2. Versuch und die Technik des Anlegens dieses Versuches ebenfalls.

Je eine Platte von jeder Nährbodenvariation wurde ohne Kohlensäure, je 2 in 10% iger Kohlensäureatmosphäre nach Haupt gehalten.

Ergebnis.

Bei der Hottinger-Serie hat sich der Zusatz von Malachitgrün nicht, der von Malachitgrün und Gentianaviolett nur unmerklich nachteilig ausgewirkt. Bei Leberagar und dessen Modifikationen zeigt sich jedoch kaum ein Unterschied, das Gesamtergebnis dieses Nährbodens ist diesmal dem Hottinger-Agar etwas überlegen, während Rindfleischagar wiederum fast ganz ausfiel. Ein Unterschied in bezug auf die Züchtungsbedingungen (mit und ohne Kohlensäure) ist nicht feststellbar.

Versuch 4.

Bei der Reinkultivierung des Bacteriums Abortus Bang aus Organmaterial oder Milch sind die Züchtungsbedingungen nicht ohne Einfluß. Ist die Reinkultur des Bact. Bang erst gelungen, so läßt es sich leicht weiterzüchten. Zur Reinkultivierung hat sich das Halten der mit dem zu untersuchenden Material beimpften Nährböden in einer 10% Kohlensäure enthaltenden Atmosphäre bewährt. Zur Herstellung

derselben werden zur Zeit hauptsächlich die Verfahren nach Huddleson (16) und nach Haupt (13) verwendet.

Durch diesen Versuch sollte herausgebracht werden, welchem von diesen beiden Verfahren der Vorzug zu geben ist, einmal in bezug auf das Wachstum der Bangbakterien und dann auch bezüglich der Handhabung. Um nicht mehrere Unbekannte in den Versuch einzuschalten, wurde hier nicht mit Bang-haltigem Organmaterial, sondern wieder mit dem aus den früheren Versuchen bekannten Abortusstamm, dessen zuverlässige Wüchsigkeit erwiesen war, gearbeitet.

Es wurde in 3 Gruppen gezüchtet. Die erste Gruppe unter aeroben Bedingungen. Bei der zweiten Gruppe kam das Huddleson'sche Verfahren zur Anwendung. Die nötige Menge Kohlensäure für ein Weckglas von $3^1/_2$ Liter Inhalt wurde erzeugt mit 5 g doppelkohlensaurem Natrium ($NAHCO_3$) plus 7 ccm Schwefelsäure. Die letzte Gruppe wurde nach dem Haupt'schen Verfahren gezüchtet. Mittels zweier Meßflaschen wurde die benötigte Menge Kohlensäure direkt aus der Stahlflasche in das Kulturgefäß geleitet und dasselbe dann luftdicht verschlossen.

Tabelle 4.

	Hottinger-agar	Leber-agar	Rindfleisch-agar
Technische Kohlensäure nach Haupt	+++++ ++++ +++++ ++++ ++++	+++++ ++++ +++++ ++++ ++++	++++ +++ +++ + +
Nasz. Kohlensäure nach Huddleson	+++++ +++++ ++++ ++++ ++++	++ + ++++ ++++ ++++	+++++ + + +++ ++
Ohne Kohlensäure	++++ +++++ ++++ +++++ +++++	? +++++ ++++ ? ++	+++++ ++++ ++++ +++++ ++++

Zeichenerklärung zu Tabelle 4:
? = Platte von Schimmel oder Verunreinigungsbakterien überwuchert, d. h. Bangkolonien nicht feststellbar.

Das Nährbodenmaterial bestand aus je 5 Platten Hottinger-Agar, Leberagar und Rindfleischagar, aber ohne Farbzusätze.

Die Art der Beimpfung der Nährböden war dieselbe wie in den vorhergehenden Versuchen.

Ergebnis.

Zwischen den beiden Kohlensäure-Züchtungsverfahren läßt sich kein wesentlicher Unterschied feststellen. Ein gleichwertiges Ergebnis zeigt sich bei Hottinger-Agar, auch bei aerober Züchtung. Der Leberagar weist mit technischer Kohlensäure besseres Wachstum auf, während der Rindfleischagar sich etwa beiderseits gleich verhält; ohne Kohlensäure zeigt derselbe jedoch genau so starkes Wachstum, wie die beiden anderen Nährböden. Im allgemeinen zeigt der Versuch kein klares Bild, da die verwendeten Bangkulturen sowohl aerob wie im Kohlensäureluftgemisch gut wachsen. Wenn etwas Positives aus dem Versuch herausgelesen werden kann, so ist es die unbedingte Stabilität des Hottinger-Nährbodens, der der allerdings schon aerobe Verhältnisse gewöhnten Kultur unter allen Umständen gute Bedingungen bietet.

Versuch 5.

Die elektive Wirkung der Farbstoffzusätze soll nun in diesem Versuch an Hand von Organmaterial ausprobiert werden. Es wurde aus der Milz banginfizierter Meerschweinchen, die zuvor mittels der Schnellblutagglutination nach Diernhofer als bangpositiv befunden wurden, gezüchtet. Die Milz dieser Tiere wurde auf aseptische Weise gewonnen und in einem sterilen Mörser zerrieben; dann wurde mit dem Pistill etwas von diesem Brei auf den Nährboden ausgestrichen. Um einen Ueberblick über den gesamten Keimgehalt des Impfmaterials zu erhalten bzw. zur Kontrolle der elektiven Kraft des Farbstoffzusatzes wurde je eine Hottinger-Agarplatte ohne Farbzusätze angelegt. Weiterhin wurden verwendet: Hottinger-Agar mit Zusatz von Gentianaviolett 1 : 250 000 + Malachitgrün 1 : 500 000; Leberagar und Rindfleischagar mit denselben Farbzusätzen. Außerdem wurde als weiterer Vergleichsnährboden der von Stockmayer in seinen Arbeiten beschriebene Rinderserum-Glyzerin-Agar verwendet, der mit den oben beschriebenen Farbstoffzusätzen sehr gute Elektivwirkung haben soll.

Die im Versuch 4 angewandten Züchtungsverfahren wurden hier nochmals ausprobiert, da ein größerer Unterschied zu erwarten war, weil die frisch aus dem Tierkörper isolierten Bangkulturen nur unter Kohlensäurespannung wachsen.

Bebrütet wurde 6 Tage bei 37° C.

Tabelle 5.

Ms. 277	Ohne Kohlensäure	Nasz Kohlensäure nach Huddleson	Techn. Kohlensäure nach Haupt
Hottinger-Agar ohne Farbzusatz	?	?	?
Hottinger-Agar mit Farbzusatz	0	?	++++
Leber-Agar	0	?	++
Rindfleisch-Agar	0	+ 1	+
Stockmayer-Agar	0	?	+++++
Ms. 279			
Hottinger-Agar ohne Farbzusatz	0	+++++ 1	++++ 1
Hottinger-Agar mit Farbzusatz	0	++++++	+++++
Leber-Agar	0	++	+++++
Rindfleisch-Agar	0	++	+++
Stockmayer-Agar	0	+++++	+++++
Ms. 281			
Hottinger-Agar ohne Farbzusatz	0	++++ 2	+
Hottinger-Agar mit Farbzusatz	?	+++++	+++
Leber-Agar	0	++	0
Rindfleisch-Agar	0	+++	+++
Stockmayer-Agar	0	+++++ 1	+++++
Ms. 283			
Hottinger-Agar ohne Farbzusatz	0 2	+++ 2	+++ 2
Hottinger-Agar mit Farbzusatz	0	+++++	+++++
Leber-Agar	0	0 1	++
Rindfleisch-Agar	0	+ 1	+
Stockmayer-Agar	0	+++++	+++++

Zeichenerklärung für Tabelle 5.

0 = kein Wachstum,
? = Platte von Verunreinigungsbakterien oder Schimmel überwuchert, sodaß keine Bangkolonien mehr festgestellt werden können,
\+ = vereinzelte Kolonien,
++ = einige Kolonien,
+++ = mehrere Einzelkolonien,
+++++ = zahlreiche Kolonien,
++++++ = sehr zahlreiche, teils zusammenfließende Kolonien,
Die Bangbegleitbakterien sind mit arabischen Zahlen bezeichnet:
1 = einzelne Kolonien,
2 = mehrere Kolonien,
3 = zahlreiche Kolonien.

Ergebnis.

Der Versuch gibt ein klares Bild über die Leistung des Hottinger-Agars, die als sehr gut bezeichnet werden kann und nur geringfügig vom Nährboden nach Stockmayer übertroffen wird. Ganz deutlich kommt auch die elektive Wirkung der Nährböden mit Farbstoffzusätzen hier zum Ausdruck. Leber- und Rindfleischagar fallen in der Leistung gegenüber den beiden anderen Nährböden ab.

Die Bangbakterien wachsen hier nur unter Kohlensäurespannung. Zwischen den beiden Verfahren nach Huddleson und Haupt kann bezüglich des Wachstums der Bangbakterien kein großer Unterschied festgestellt werden. Die Zahl der Begleitbakterien ist bei dem Hauptschen Verfahren etwas geringer. Schließlich konnte ich auch noch feststellen, daß durch die Schwefelsäure bei dem Huddleson'schen Verfahren in dem Kulturgefäß eine sehr feuchte Atmosphäre entsteht, durch die die Bildung von Schimmel gefördert wird. Ich gab deshalb dem Haupt'schen Kulturverfahren mit technischer Kohlensäure den Vorzug, da es neben oben erwähnten Vorteilen auch einfacher zu handhaben ist und verwandte für die weiteren Versuche nur noch diese Methode.

Versuch 6.

Eine der wichtigsten Fragen in der Bekämpfung des seuchenhaften Verkalbens wie auch der Milchhygiene ist die möglichst rasche Erfassung und Unschädlichmachung der Tiere, die Bangbakterien mit der Milch ausscheiden. Meine weiteren Versuche befaßten sich deshalb mit der Prüfung, inwieweit sich der neue Hottinger-Nährboden zur Reinkultivierung des Bact. ab. Bang aus der Milch eignet und den Meerschweinchenversuch ersetzen kann. Bei der Kultivierung des Bact. ab. Bang aus der Milch ist besonders die elektive Wirkung eines Nährbodens von Wert, da die Milch fast immer mit Verunreinigungsbakterien stark durchsetzt ist.

Die Milch wurde mir aus einem stark banginfizierten Bestand zur Verfügung gestellt. Zu diesem und den folgenden Versuchen wurden nur Milchproben verwendet, die vorher mittels der Agglutination und des Meerschweinchenversuches sich als positiv erwiesen. Die Entnahme der Proben erfolgte gelegentlich des Melkens, eine aseptische Gewinnung der Milch war dabei nicht beabsichtigt, da der Nährboden ja seine elektive Kraft beweisen sollte. Es wurde stets von allen 4 Eutervierteln in eine Probe zusammengemolken. Da eine Verarbeitung der Proben am selben Tage meist nicht möglich war, wurde die Milch 1—2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Gezüchtet wurde auf Hottinger-Nährböden und Stockmayer'schem Nährboden, beide mit Farbzusätzen wie in den vorhergehenden Ver-

suchen und nach dem Haupt'schen Verfahren. Die Platten wurden 4 Tage bei 37° C bebrütet. Nach vorherigem Durchschütteln der Milch wurden je 10 ccm im Spitzglas 40 Minuten lang zentrifugiert und vom Bodensaz je 0.05 ccm auf die Platten gebracht und mit dem Glasspatel ausgestrichen. Zur Gewinnung des Bodensatzes schien mir die von Stockmayer beschriebene Methode am besten geeignet. Man geht mit einer, oben mit dem Finger verschlossenen Pipette auf den Grund des Spitzglases, nimmt dann den Finger weg, so daß der am Grund des Spitzglases sich befindliche Bodensatz in die Pipette eindringt. Die gewünschte Menge kann auf diese Weise leicht entnommen werden.

Tabelle 6.

Milchprobe Nr.	Hottinger-Agar	Stockmayer-Agar
39	+2	?
45	++	+++
58	0	+1
61	0	?
71	++2	++2
78	+++1	++2-3
8	+	+++1
13	+1-2	+2-3
79	+++1	++1-2

Zeichenerklärung:
• = kleine Kolonien von Bact. Abortus Bang
■ = große Kolonien von Bact. Abortus Bang
Die übrigen Zeichen sind dieselben wie im vorhergehenden Versuch.

Ergebnis.

Das Ergebnis kann zusammengefaßt als gut bezeichnet werden, als in nur einer Probe der Kulturnachweis nicht gelang. Die beiden verwendeten Nährböden zeigen etwa gleiches Ergebnis, die Zahl der Begleitbakterien beim Hottinger-Agar ist etwas geringer.

Es läßt sich ferner aus diesem Versuch ersehen, daß es ratsam ist, jeweils mehrere Platten zu beimpfen, da leicht die Möglichkeit be-

steht, daß eine Probe verschimmelt oder die Begleitbakterien alles überwuchern.

Die Bangkolonien wurden als solche angesprochen, wenn sie sich nach Agglutination und mikroskopischer Untersuchung als solche erwiesen. Sie zeigen außerdem ein typisches Wachstum, runde, halbkugelförmige, glänzende und durchsichtige Kolonien von bläulich violetter Farbe, die sich von den Kolonien der Begleitbakterien leicht unterscheiden. Außerdem ist ihnen ein widerlich fader Geruch eigentümlich.

Versuch 7.

Da es praktisch nicht immer möglich sein wird, die Milchproben sofort zu verarbeiten, habe ich dem vorigen Versuch einen weiteren angeschlossen, in dem dieselbe Milch, aber konserviert, verwendet wurde. Bei der Konservierung hat sich die Borsäure bisher bewährt. Ich habe deshalb auch bei meinem Versuch zur Konservierung der Milch 1% Borsäure angewendet, die denselben Milchproben wie im 6. Versuch zugesetzt wurde. Die konservierte Milch wurde 4 Tage lang aufbewahrt und auf Nährböden, wie schon früher beschrieben, verimpft.

Das Ergebnis zeigt die Tabelle 7.

Tabelle 7.

Milchprobe Nr.	Hottinger-Agar	Stockmayer-Agar
39	0	+
45	++	+++
58	0	0
61	+	+
71	0	0
78	0	+
8	0	++
13	+	++
79	++++	++++

Ergebnis.

Der Zusatz von Borsäure hat den Gehalt an Begleitbakterien entschieden verringert, obwohl die Proben 4 Tage lagerten, gleichzeitig scheinen jedoch auch die Abortus-Bangbakterien bei einzelnen Proben geschädigt worden zu sein, was beim Hottinger-Agar in der Wachstumsdichte und in der Zahl der positiven Ergebnisse zum Ausdruck kommt. Der Hottinger-Agar bleibt in diesem Versuch gegenüber dem Rinderserumagar stark zurück, nachdem dies im vorigen Versuch nicht zum Ausdruck kam. Auch das Wachstum der Abortus-Bangkolonien unterscheidet sich bei beiden Nährböden, insoferne als bei dem Stockmayer-Agar durchwegs große, üppige Kolonien, dagegen beim Hottinger-Agar fast nur kleine Kolonien erscheinen.

Nach diesem Ergebnis würde also der Stierhodennährboden nach Hottinger keine Vorzüge bieten gegenüber anderen Nährböden. Da es jedoch nicht nur meine Aufgabe war, diesen Nährboden auf seine Eignung zur Bangzüchtung überhaupt auszuprobieren, sondern durch geeignete Zusätze denselben in seiner Leistungsfähigkeit zu verbessern, gab ich nun noch einen weiteren Zusatz von 10% sterilem Rinderserum, nachdem ich seither schon Traubenzucker und Glyzerin zugefügt hatte. Der Zusatz des Rinderserums ist es nämlich, was den Stockmayer-Agar zur Züchtung von Abortus-Bang geeignet macht. Das Serum wurde dem flüssigen Agar nach Abkühlenlassen auf etwa 40° C zugesetzt, kurz durchgeschüttelt und dann in Platten ausgegossen.

Versuch 8.

Mit diesem abgeänderten Nährboden legte ich nun einen Probeversuch mit Abortus-Bangkultur an. Es wurde dazu ein Hottinger-Agar ohne Rinderserum, ein solcher mit Zusatz von Rinderserum und außerdem der Rinderserumagar nach Stockmayer verwendet. Alle Nährböden natürlich mit Zusatz von elektivierenden Farbstoffen. Das Impfmaterial bildeten 2 Bangstämme, von denen Bakterienaufschwemmungen hergestellt wurden. Von dieser Aufschwemmung wurden 0.05 ccm auf eine Platte gebracht, mit einem Glasspatel ausgestrichen und das demselben anhaftende Material auf einer zweiten Platte nochmal ausgestrichen, um eine dünne Verteilung der Abortus-Bangbakterien zu erreichen.

Tabelle 8.

Stamm		Hottingeragar + Traubenz. + Glyzerin	Hottingeragar + Traubenz. + Glyz. + 10% Rinderserum	Stockmayer agar
Ab. Bang Stamm 8	a	+++++	+++++	+++++
	b	+++	++++	++++
Ab. Bang Stamm R 23	a	+++++	+++++	+++++
	b	++	+++++	++++

Ergebnis.

Der Rinderserumzusatz fördert das Wachstum der Bangkulturen beträchtlich, wie aus Tabelle 8 klar hervorgeht. Jedoch ist gegenüber dem Rinderserumagar nach Stockmayer kein sehr großer Unterschied festzustellen; nur auf dem zweiten Platten ist das Wachstum auf diesem Nährboden etwas geringer. Die Abortus-Bangkolonien weisen jedoch auf dem Hottinger-Agar mit Serumzusatz allgemein ein größeres und dickeres Wachstum auf. Ob dieses Ergebnis auch unter praktischen Verhältnissen zu erreichen war, sollten Versuche mit Milch zeigen.

Die folgenden 3 Versuche befaßten sich mit Züchtung der Abortus-Bangbakterien aus der Milch auf Hottinger-Agar mit Rinderserumzusatz und auf 10%igem Rinderserumagar nach Stockmayer. Es sollte dabei eine größere Menge von Einzelergebnissen gesammelt werden, um ein Urteil über die Leistungsfähigkeit und die Eignung des Hottinger'schen Nährbodens aussprechen zu können.

Es wurden jeweils 15 Milchproben aus demselben Bestand wie die, die in Versuch 6 und 7 zur Anwendung kamen, verarbeitet. Die Milchproben wurden immer mit der Stallnummer des betreffenden Tieres bezeichnet. Da immer dieselben Proben verwendet wurden, ließ sich leicht ein Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen aufstellen. Wie vorher handelte es sich durchweg um Milch von Tieren, die bestimmt Dauerausscheider waren. Da es möglich war, die Milchproben jedesmal etwa 15—20 Stunden nach der Entnahme zu verarbeiten, wurde auf die Konservierung mit Borsäure verzichtet.

Erwähnt werden soll noch, daß diese 3 Versuche jeweils mit einem Abstand von 1 Woche angelegt wurden.

Versuch 9.

Die Milchproben wurden 40 Minuten zentrifugiert und dann der Bodensatz auf die Nährböden ausgestrichen. Es wurde dazu je 1 Platte Hottinger-Agar ohne Serum verwendet; weiterhin je 2 Platten Hottinger-Agar mit Serumzusatz und Rinderserumagar nach Stockmayer. Bei ersterem wurden 0,05 ccm des Bodensatzes auf der Platte ausgestrichen. Bei den beiden anderen Nährböden wurde jeweils auf die erste Platte 0,05 ccm des Bodensatzes gebracht, das Material mit dem Glasspatel ausgestrichen und dann mit demselben Spatel die zweite Platte noch beimpft. Dadurch sollte die Gefahr der Ueberwucherung von Platten durch Begleitbakterien verringert werden.

Der Versuch gab gleichzeitig einen Vergleich zwischen dem Hottinger-Nährboden mit und ohne Serumzusatz.

Tabelle 9.

Milchprobe Nr.	a Hottinger Agar	Hottinger-Agar a	b + Serumzus. b	Stockmayer - a	Rinderserum-Agar b
39	+	+	+	+$_1$	0
45	+$_{2-3}$	+++	+	++	+
58	+++	+++	++$_1$	+++$_1$	+$_2$
61	+$_1$	++$_1$	+	++	0
71	+	+	+	+	+
78	+$_1$	++$_1$	+$_1$	+$_1$	0$_1$
8	+++	++++$_2$	++++$_1$	+++	+$_1$
13	0$_1$	0$_1$	0$_{1-2}$	0$_1$	0
79	0	0	0	0$_1$	0
60	0	0	0	+	0
63	+	+$_1$	+	+	+
29	++++	+++++	++++$_1$	+++	+++
40	+++	+++	+	+++	+
43	0	+	0	+	0
55	++	++	+	++	+

Versuch 10.

Dieser Versuch wurde an den vorhergehenden gleich angeschlossen, da die verwendeten Milchproben und Nährböden ja dieselben waren, nur daß sie 1 Woche später entnommen und angelegt wurden. Es wurde lediglich der Hottinger-Agar ohne Serum weggelassen. Ein Unterschied wurde dagegen in der Behandlung der Milchproben gemacht. Dieselben wurden geteilt und davon die eine Hälfte 40 Minuten zentrifugiert und der Bodensatz wie zuvor auf je 2 Platten verimpft (siehe Tabelle 10a).

Tabelle 10a.

Milchproben Nr.	40 Minuten zentrifugiert			
	Hottinger-Agar + Serum		Stockmayer Rinderserumagar	
	a	b	a	b
39	+1	+1	+++	++
45	+++	++	++++	+++
58	++	+	+++1	++
61	++	++	++	+
71	+1	01	+	0
78	0	++1	?	+1
8	+++	++	+++	++
13	+	0	+	+
79	0	0	0	0
60	+++	+++	+++1	++
63	?	++1	02	++2
29	++++1	++	++++	+++
40	+++	+++	+++	++
43	0	0	+1	0
55	+	+	++1	0

Die andere Hälfte habe ich nach den Angaben Klitschmüllers (21) verarbeitet. Zur Entfernung von Verunreinigungsbakterien und von Schmutz wurden die Proben 5 Minuten zentrifugiert und dann die Milch vom Bodensatz abgegossen. Zu dieser abgegossenen Milch (10 ccm) wurde 0,1 ccm hochwertiges bangagglutinierendes Serum von Titer 1 : 8000 zugegeben, die Proben hierauf 2 Stunden bei 37° C gehalten und nochmals 20 Minuten ausgeschleudert. Bei dieser Methode sollen sich die Abortus-Bangbakterien in der Milch unter dem Einfluß des agglutinierenden Serums zusammenballen und sich dann leichter ausschleudern lassen. Der Bodensatz wurde wie oben verimpft (siehe Tabelle 10b).

Tabelle 10b.

Milchproben Nr.	5 Minuten zentrif. + 0,1 ccm aggl. Serum + 20 Minuten zentrifugiert			
	Hottinger-Agar + Serum		Stockmayer-Rinderserumagar	
	a	b	a	b
39	+	0	+	0
45	++	++	+++	+
58	++	+	+++	+2
61	++	++	++1	+
71	+1	0	+	0
78	+1-2	01	++1	+1
8	++1	++	+++	++
13	0	+	+1	0
79	01	01	01	0
60	+1	+	++1	+
63	?	?	0	0
29	++1	++	+++	+
40	+1	0	++1	+
43	0	01	+	0
55	01	0	+	+

Versuch 11.

Wie oben erwähnt, glich auch dieser Versuch den vorhergehenden. Jedoch war die Art der Verarbeitung der Milchproben wiederum anders. Ich habe die Proben wiederum in 2 Teile geteilt und davon den Bodensatz der einen Hälfte nach 40 Minuten langem Zentrifugieren auf Platten verimpft. Leider stand mir diesmal nur jeweils eine Platte zur Verfügung (siehe Tabelle 11a).

Tabelle 11a.

Milchprobe Nr.	Hottinger-Serum Agar	Stockmayer-Agar
39	+1	++1
45	+++1	+++
58	++	+1
61	0	+
71	0	0
78	0	0
8	++++1	+++++1
13	+	++
79	++	+++
60	0	0
63	0	0
29	+++	+++
40	++++1	++++
43	01	+
55	+1	++1

Die übriggebliebene Menge Milch wurde fraktioniert zentrifugiert, wieder nach Angaben von Klitschmuller, wodurch die Begleitbakterien entfernt werden sollen, da dieselben zuerst in den Boden-

satz übergehen. Zuerst wurde 8 Minuten zentrifugiert und dann die Milch vom Bodensatz abgegossen und dieselbe nochmals 30 Minuten zentrifugiert. Um das Verhalten der Begleitbakterien beim ersten Ausscheiden zu erforschen, habe ich auch diesen ersten Bodensatz auf Nährböden verimpft.

Ergebnis siehe Tabelle 11b und 11c.

Tabelle 11b.

Milch-proben Nr.	8 Minuten zentrifugiert	
	Hottinger-Serum-Agar	Stockmayer-Agar
39	+3	+3
45	02	+++
58	+	+++
61	+	++
71	+	01
78	0	+
8	++1	+++1
13	+1	+++
79	++1	++1
60	01	++
63	01	+
29	+++	+++
40	++++	++++
43	+	+1
55	++	++1

Tabelle 11c.

Milchprobe Nr.	Abgegossene Milch 30 Minuten zentrifugiert	
	Hottinger-Serum-Agar	Stockmayer-Agar
39	0 1	0 1
45	0 2	0
58	+	+
61	0 1	0
71	0 1	0 1
78	0	0
8	+	+++
13	0	+
79	+	+
60	0	0
63	0	0 1
29	?	+ 3
40	++	++
43	0	0 5
55	0	+

Ergebnis der Versuche 9, 10 und 11.

Die Ergebnisse der Versuche 9, 10 und 11 konnten zusammengefaßt werden, da jeweils dieselben Milchproben und dieselben Nährböden verwendet wurden und nur in der Art der Behandlung der Milch ein Unterschied gemacht wurde. Die Menge der Ergebnisse gestattete auch ein abschließendes Urteil über die Leistungsfähigkeit und Anwendung des Hottinger'schen Nährbodens, auch im Vergleich mit dem Rinderserumagar nach Stockmayer. Das läßt sich am besten in

Zahlen ausdrücken, indem man die Ergebnisse aller Versuche zusammenzählt. Die Versuche, bei denen Hottinger-Agar ohne Serumzusatz verwendet wurde, sollen jedoch gesondert behandelt werden. Außerdem können die Ergebnisse auf Tabelle 10b und 11b und 11c als je ein weiterer Versuch gerechnet werden, da die Nährböden dieselben waren und nur die Verarbeitung der Milch anders war.

In den Versuchen 6, 7 und 9 wurden insgesamt 33 Milchproben verimpft auf je 1 Hottinger-Agar ohne Serum und je eine Stockmayer-Agarplatte (in Versuch 9 wurde nur die 1. Platte von Stockmayer-Agar mitgezählt). Von diesen 33 Hottinger-Agarplatten lieferten 22 ein positives Ergebnis, also 67%; von dem Stockmayer-Agar waren 27 Platten positiv, also 82%; dabei wurden diejenigen Platten mit zweifelhaftem Ergebnis nicht mitgerechnet. Alles zusammen wurden von den 33 Milchproben 28 als positiv festgestellt, das sind also 85%.

Die nächsten Versuche 9, 10a, 10b, 11a, 11b und 11c, bei denen Hottinger-Agar mit Serumzusatz und Stockmayer-Agar zur Anwendung gelangten, ergaben insgesamt 90 Milchproben, die auf 135 Hottinger- und ebensoviel Stockmayer-Nährböden verimpft wurden. Davon wiesen 86 Platten vom Hottinger-Agar ein positives Ergebnis auf, das sind 64%; mit Stockmayer-Agar ließen sich auf 98 Platten Abortus-Bangbakterien nachweisen, das wäre also in 73% der Fälle. Bei den Versuchen 9, 10 und 11 konnten auf Hottinger-Serumagar, wenn die verschimmelten, von Begleitbakterien überwucherten und deswegen nicht ablesbaren Platten nicht eingerechnet werden, 28mal gar keine Bangbakterien nachgewiesen werden, auf Stockmayer-Agar dagegen nur 18mal.

Insgesamt konnten auf beiden Nährböden zusammen von den 90 Milchproben in 73 Fällen Abortus-Bangbakterien nachgewiesen werden, also in 81% der Proben. Dabei muß aber noch erwähnt werden, daß verschiedene Male ein zweifelhaftes Ergebnis herauskam, das mit ? bezeichnet wurde und nicht mitgerechnet werden konnte. Das Gesamtergebnis wird auch durch den letzten Versuch, der auf Tabelle 11c festgehalten ist, wesentlich verschlechtert; ich möchte denselben jedoch nicht weglassen, da er zur Gesamtbeurteilung der Nährböden beiträgt. Betrachtet man die Versuche einzeln, so kommt der Stockmayer-Agar in Tabelle 11b am besten weg. Hier werden von 15 Proben 14 als positiv eruiert, was 93% entspricht. Die Milchprobe 7, die beim Stockmayer-Agar negativ bleibt, wird jedoch durch den Hottinger-Agar erfaßt, so daß der Versuch 11b insgesamt 100%iges Ergebnis zeitigt.

Auffallend bei den Versuchen war auch der gänzliche Ausfall der Proben 79 und 13 in den Versuchen 9 bzw. 9 und 10, nachdem diese Milchproben vorher und nachher auch wieder positiv waren. Es hängt

dies wohl mit dem Wechsel der Ausscheidung der Bangbakterien zusammen, die einmal stärker und dann wieder schwächer sein, vielleicht zeitweise ganz sistieren kann. Auch bei den übrigen Proben ist ein Schwanken in der Menge der Abortus-Bangbakterien festzustellen.

Auf Grund dieser Tatsache erscheint es bei der Diagnosestellung mit Hilfe des Kulturversuches notwendig, bei einmalig negativen Milchproben es nicht bei der ersten Untersuchung bewenden zu lassen, sondern nach einigen Wochen dieselbe zu wiederholen.

Was die Behandlung der Milchproben und ihre Verarbeitung anbelangt, so wurden bei allen Versuchen die besten Resultate durch einmaliges Zentrifugieren erreicht. Wie Versuch 11 auf Tabelle 11b zeigt, genügten dazu schon 8 Minuten. Der Versuch der Anreicherung der Bangbakterien durch agglutinierendes Serum hat sich nicht bewährt. Ebenso konnten durch fraktioniertes Zentrifugieren keine besseren Erfolge erzielt werden. Es konnte bei dieser Methode nicht verhindert werden, daß beim ersten kurzen Ausschleudern auch Abortus-Bangbakterien mit in den Bodensatz übertraten, was bei einer an sich schon bangbakterienarmen Milch zu einem Mißlingen des Versuches führen kann, wie Tabelle 11b und 11c zeigen.

Die Unterdrückung der Begleitbakterien in der Milch ließ sich durch Zusatz von 0,5—0,75% Borsäure durchführen; aus Versuch 7, Tabelle 7, geht hervor, daß 1% Borsäure bereits die Bangbakterien etwas schädigte. Für am besten halte ich jedoch die möglichst schnelle Beförderung der Milch vom Entnahmeort zur Untersuchungsstelle und deren kühle Lagerung daselbst, wie ich es bei den Versuchen 6, 9, 10 und 11 gemacht habe. Trotzdem zwischen der Entnahme und der Verarbeitung oft über ein Tag Zwischenraum war, konnte kein Ueberhandnehmen der Begleitbakterien festgestellt werden, obwohl die Entnahme der Milch unter wenig aseptischen Voraussetzungen geschah. Es hat sich jedoch in den Versuchen bewährt, wenn jeweils mehrere Platten beimpft wurden, da es manchmal vorkommen kann, daß eine Platte verschimmelt, so daß nachher keine Bangkolonien mehr nachgewiesen werden können.

Zum Wachstum der Bangkolonien kann noch gesagt werden, daß dieselben auf beiden Nährböden in gleicher, bereits früher beschriebener Form wachsen. Auf dem Stockmayer'schen Rinderserumagar nehmen sie allerdings eine etwas dunklere, bräunliche Färbung in der Durchsicht an, als auf Hottinger-Serumagar. In der Aufsicht ist jedoch der bläuliche Schimmer bei beiden Nährböden vorhanden. Mengenmäßig und was die Größe der Kolonien anbelangt, ist der Stockmayer'sche Nährboden dem Hottinger-Agar überlegen; dies kommt auch schon in den oben beschriebenen zahlenmäßigen Vergleichen zum Ausdruck.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß der Hottinger'sche Stierhodennährboden sich zur Züchtung der Abortus-Bangbakterien aus der Milch wohl eignet, nicht aber die Ergebnisse hervorbringt wie der seither viel verwendete Rinderserumagar nach Stockmayer. Beide Nährböden aber leisten in der hier angewandten Zusammensetzung noch nicht so viel, um bei Feststellung von Dauerausscheidern den Kulturversuch an die Stelle des Tierversuches stellen zu können. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß dieses Ziel durch weitere Verbesserung der Nährböden und der Technik erreicht werden kann.

Das Gesamtergebnis beider verwendeter Nährböden aus den Versuchen 6, 7 und 9a mit 85% und aus den Versuchen 9b, 10 und 11 mit 81% positiven Ergebnissen kann jedoch als gut bezeichnet werden. Läßt man außerdem die Ergebnisse des letzten mehr oder weniger mißglückten Versuches auf Tabelle 11c weg, so gelang der Abortus-Bangbakteriennachweis in den Versuchen 9b, 10 und 11, also auf den Tabellen 9b, 10a, b, 11a, b in 88% der Fälle.

Zusammenfassung

Meine Untersuchungen galten der Prüfung des Stierhodennährbodens nach Hottinger auf seine Eignung zur Züchtung von Brucella abortus Bang. Das Untersuchungsmaterial bildeten Bangkulturen, banginfizierte Organe von Meerschweinchen und Milch von Dauerausscheidern.

1. Der Stierhodennährboden nach Hottinger eignet sich sowohl in Form von Bouillon, als auch als fester Nährboden sehr gut zur Züchtung von Abortus-Bangkulturen.
2. Durch Zusatz von 0,5% Traubenzucker und 2% Glyzerin zum Hottinger-Agar wird das Wachstum der Abortus-Bangkulturen unterstützt.
3. Bei Zusatz von Gentianaviolett 1 : 250 000 und Malachitgrün 1 : 500 000 kann keine Hemmung der Bangkulturen auf Hottinger-Agar festgestellt werden.
4. Das Kultivierungsverfahren nach Huddleson mit nascierender Kohlensäure bietet gegenüber dem Haupt'schen Verfahren mit technischer Kohlensäure keine Vorteile. Bei letzterem zeigt sich auf den Nährböden gleichmäßigeres Wachstum der Bangkulturen; außerdem ist es einfacher in der Handhabung und neigt weniger zur Begünstigung der Schimmelbildung, da die Atmosphäre nicht feucht ist.
5. Der Hottinger'sche Stierhoden-Agar mit Zusatz von Traubenzucker und Glyzerin sowie den elektivierenden Farbstoffzusätzen liefert bei Züchtung der Abortus-Bangbakterien aus Organen infizierter Meerschweinchen ebenso gute Ergebnisse wie der sonst

gebräuchliche Leberagar und der Rinderserumagar nach Stockmayer.

6. Bei direkter Kultivierung der Abortus-Bangbakterien aus Milch von Dauerausscheidern erreichte der Hottinger-Agar mit obigen Zusätzen die Leistung des Stockmayer-Agars nicht ganz.
7. Die Unterdrückung der Begleitbakterien durch die obengenannten Farbzusätze ist auf beiden Nährböden gut; auf Hottinger-Agar waren dieselben 13mal in geringerer Zahl durchgekommen, auf Stockmayer-Agar dagegen 22mal
8. Die Konservierung der Milch gelingt mit Borsäure. Der Zusatz von 1% Borsäure schädigt jedoch bereits die Bangbakterien in geringem Ausmaß.
9. Der Zusatz von 10% sterilem Rinderserum zum Hottinger-Agar bringt eine weitere Wachstumsförderung der Bangkulturen mit sich. Dieselben bilden dickere und meist konfluierende Kolonien.
10. Bei der Verarbeitung der Milchproben wurden die besten Ergebnisse erzielt bei einmaligem Zentrifugieren der Milch während 30—40 Minuten. Es genügten jedoch auch schon 8—10 Minuten. Nicht bewährt hat sich fraktioniertes Ausschleudern und Anreicherung der Brucella Abortus Bang in der Milch durch Zusatz von bangagglutinierendem Serum.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Beck, Direktor der Veterinärpolizeilichen Anstalt Schleißheim für die Ueberlassung des Themas sowie für die vielseitigen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, meinen aufrichtigen Dank zu sagen.

Gleichzeitig möchte ich nicht versäumen, Herrn Veterinärmedizinalrat Dr. Enzenbach für seine Ratschläge und die liebenswürdige Unterstützung meiner Arbeit ebenfalls herzlichst zu danken.

Literatur

1. Ascoli, A.: Technische Winke zur Züchtung des Bang'schen Bazillus. BTW. 1913. S. 301.
2. Churchman: Zit. nach Stockmayer. Zeitschrift für Infektionskrankheiten der Haustiere. 1933. Bd. 4. S. 107.
3. Drescher und Hopfengärtner: Die Haltbarkeit des Bang'schen Abortusbazillus in der Milch und den Milchprodukten. MTW. 1930. S. 465.
4. Ehrlich: Erfahrungen mit verschiedenen diagnostischen Methoden zur Feststellung des seuchenhaften Verkalbens. DTW. 1928. S. 56.
5. Evans, A. C.: The Presence of Bact. abort. in Milk. Zbl. f. Bakt. I. Ref. Bd. 63. S. 526 (1915).
6. Evans, A. C.: Bac. ab. in market milk. Zbl. f. B. I. Ref. Bd. 66. S. 133.
7. Fitch, C. P.: 1922. The Cultivation of Bact. Ab. Bang. Zbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 75. S. 273.
8. Fleischhauer: Zum Tierversuch im Rahmen der Feststellung von Abortus Bangbakterien in der Milch. DTW. Nr. 41. 1933. S. 152.
9. Fried: Zur Epidemiologie, Klinik und Bakteriologie der Bangschen Krankheit. Ztschr. f. Hyg. Bd. 114. S. 448 (1932/33).
10. Frisch: Die Leuchtgasmethode zur Züchtung des Bakt. ab. Bang. DTW. 1929. S. 309.
11. Gorlani, Antonie: La dimonstrazione de Bact. di Bang nel latte. Jahresber. f. Vet. Med. 1935. S. 79.
12. Haal, A.: Diagnost. Züchtungsversuche zur Feststellung der Brauchbarkeit verschiedener Farbnährböden zur Kultur des Ab. Bang Bakt. aus der Milch. Inaug. Diss. Leipzig 1933.
13. Haupt, H.: Kurze Mitteilungen über einen zur Züchtung von Bact. ab. Bang geeigneten Nährboden. Zbl. f. Bakt. Orig. Bd. 120. S. 130.
14. Hauptmann, W.: Ein elektives Kulturverfahren zum Nachweis von Bangbakterien (Bruc. abort.) im Patientenblut. Zbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 73. 1922. S. 177.
15. Hohn und Hermann: Der Kulturtyp der Erreger der Typhus-Paratyphusgruppe und seine Bedeutung für die Standortsgebundenheit. Z. f. Infekt.-Krankh. d. Haust. 117. 1935. S. 722.
16. Huddleson: Studies in infektions. abortion. Zbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 73. 1922. S. 177.

17. Karsten: Ueber das Vorkommen und den Nachweis von Abortusbakterien in der Milch der Kühe. DTW. 1932. Nr. 40 S. 689.

18. Karsten und Bischoff: Weitere Untersuchungen über den Abortusnachweis in der Milch. DTW. 1933. Nr. 41 S. 593.

19. Klimmer: Abortus Bang und Milchhygiene. BTW. 1932. Nr. 48 S. 87.

20. Klimmer und Klitschmüller, P.: Abort.-Bang-Bakteriennachweis in der Milch. BTW. 1936. S. 326.

21. Klitschmüller: Zum zücht. Nachweis von Bruc. ab. Bang in der Milch. Inaug. Diss. Leipzig 1936.

22. Köser und Plate: Morphologischer Nachweis der Bruc. Ab. Bang in der Milch. DTW. 1934. S. 195.

23. Lerche: Ab. Bang.-Bac. in Milch und Milchprodukten. Z. f. Infekt.-Krankh. d. Haustiere. Bd. 38. 1931. S. 268.

24. Lübke: Eine neue und einfache Methode der Bangbakterienzüchtung. DTW. 1933. S. 646.

25. Nowak: Le bazille de Bang et sa biologie. Ann. de L'Institut Pasteur T 22, p. 541 (1908). Zit. n. Klitschmüller 21.

26. Plate: Die Feststellung von Brucella Abortus in der Milch bei der Milchüberwachung. DTW. 1934. Nr. 42. S. 537.

27. Pröscholdt, O.: Die Feststellung der Ausscheidung von Ab. Bangbakterien mit der Milch. DTW. 1932. Nr. 42 S. 673.

28. Pröscholdt, O.: Zum Nachweis von Abortus-Bangbakterien in der Milch. Zeitschr. f. Fl. und Milchhyg. 1922. Nr. 39 S. 277.

29. Rudolf, J.: Beitrag zur Züchtung des Bac. Ab. Bang mit Hilfe der Leuchtgasmethode. DTW. 1928. II. S. 481.

30. Smith, Th.: Some cultural characteristics of Bac. ab. Bang with spezial reference to CO_2 requirements. Zbl. f. Bakt. Bd. 78. Abt. I. Ref. S. 136. 1925.

31. Smith and Fabyan: Zit. n. Zwick (43). Zbl. f. Bakt. I. Orig. 61. 549. 1912.

32. Schäffer: Ein Hilfsmittel zur bakteriologischen Untersuchung proteushalt. Materials. Berl. klin. Wschr. 1918. Nr. 55. S. 637.

33. Schröder, F. C., und Cotton, W. F.: An undescribed pathogenic. Bact in Milk. Anmer. Vet. Ref. 40. S. 195. 1911.

34. Stafseth, H. J.: A few notes an the isolation and cultivation oft bact. Abortus with spezial reference to liver and speen media. Michigan Agriculture coll. Exp. Sta. Techn. Bull. Nr. 49. p. 7. 1920. Zbl f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 72. S. 366. 1921.

35. Stafseth und Huddleson: Studies in infectous abortation. Michigan State Tech. Bull. Bd. 49. Jahresber. f. d. Vet. Med. Ref. Bd. 49. S. 63. 1923.

36. Steck, W.: Ueber das Vorkommen der Bakt. ab. infect. Bang in der Milch gesunder Kühe. Schweizer Archiv f. Tierheilkunde. Bd. 60. S. 547.

37. Stickdorn: Die Alkalität der Nährböden nach der Michaelis'-schen Indikationsmethode in ihren Beziehungen zum Bakterienwachstum Z. f. Immunitätsforschg. Orig. Bd. 33. S. 576.

38. Stockmayer: Die Feststellung von Bangbaz. in Einzel- und Gruppenmilchproben mit Hilfe von Elektivnährböden. Zbl. f. Bakt. 1933. Nr. 128. S. 205.

39. Stockmayer: Kulturelle Untersuchungen über die Ausscheidung von Bangbakterien mit der Milch. Ztschr. f. Inf. paras. Krankheiten der Haustiere. Bd. 44. S. 105. 1933.

40. Stockmayer: Vergleichende Untersuchungen über den Bakteriengehalt von Rahm, Butter, Mager- und Buttermilch sowie Versuche über die Konservierung von Milchproben. Zbl. f. Bakt. 133. 1934/35 S. 425.

41. Stockmayer: Untersuchungen über die Bangbakterieninfektion des Euters, über den Verlauf der Ausscheidung der Bangbakterien und ihre Feststellung. Ztschr. f. Infekt. paras. Krankheiten d. Haustiere. 49. S. 41. 1936.

42. Summa, H.: Vergl. Untersuchungen zum Nachweis von Bakt. Ab. Bang in der Milch. Inaug. Diss. 1934. Gießen.

43. Thompson, Redvers.: Elimination of Bruc. ab. with the milk. of. „carrier" cows. J. inf. Diss. 55. 7—11. 1934.

44. Weigmann: Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Bact. ab. Bang und Bact. melitense. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 121. 318. 1931.

45. Winkler: Ueber die Ausscheidung des Bac. abort. Bang mit der Milch. Inaug. Diss. Leipzig. 1919. Ref. Jahresber. über die Vet. Med. 1919/20. Bd. 39—40. S. 76.

46. Zeller: Weitere Untersuchungen über das seuchenhafte Verwerfen des Rindes. Archiv f. Tierheilkunde. Bd. 49. S. 65. 1922.

47. Zwick: Forschungen über das seuchenhafte Verwerfen des Rindes während der letzten zwei Jahrzehnte. Arb. a. d. R.G.A. Bd. 57 S. 360.

Lebenslauf

Am13. Juni 1914 wurde ich, Fritz Wilhelm Bräuninger, auf Gut Hammetweil bei Neckartenzlingen in Württemberg als Sohn des Gutspächters Fritz Bräuninger geboren. Ich besuchte von September 1920 bis April 1922 die Elementarschule in Tübingen. Vom Mai 1922 ab kam ich auf die Oberrealschule in Tübingen und verließ diese Anstalt nach Bestehen der Reifeprüfung im Februar 1932. Darauf widmete ich mich dem Studium der Tierheilkunde an der Universtät in München und an den tierärztlichen Hochschulen in Berlin und Hannover. Im Dezember 1936 legte ich in München die Staatsprüfung ab. Meine dreimonatliche Ausbildung in der Fleischbeschau und Lebensmittelüberwachung genoß ich am Städt. Schlachthof in Heilbronn a. N. Von April bis Juni 1937 war ich an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Oberschleißheim zum Vorbereitungskurs für den Staatsdienst.

Mit Anfertigung vorliegender Arbeit war ich von August 1936 bis Juni 1937, abgesehen von einer Unterbrechung von 5 Monaten, beschäftigt.